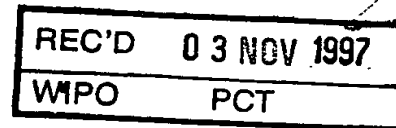


9/242343
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP 97 / 0 4 3 5 3



Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT

Die Herren Dipl.-Ing. Dirk V o l l e n - b r o i c h ,
Priv.-Doz. Dr. Joachim V a t e r , Professor Dr. Georg
P a u l i und Frau Professor Dr. Roza Maria K a m p ,
alle in Berlin/Deutschland, haben eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten
Viren"

am 12. August 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 12 N und A 61 K der Internationalen Patentklassifika-
tion erhalten.

München, den 26. September 1997
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Faust

Abkürzungen: 196 33 684.8

5

10

Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren

BESCHREIBUNG

15

20

Die Erfindung betrifft ein äußerst effizientes Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren, wie z.B. Herpes- oder Retroviren, in biologischen oder biotechnologischen - insbesondere pharmazeutischen - Produkten und in Zellkulturen, indem ein zyklisches β -Hydroxyfettsäure- und β -Aminofettsäure-haltiges Peptid (Lipopeptid) oder ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren Salze in bestimmten Konzentrationen zugesetzt werden. Es hat sich gezeigt, daß Lipopeptide ein überraschend hohes Inaktivierungspotential für lipidumhüllte Viren aufweisen und daneben den Vorteil einer sehr geringen in vivo-Toxizität bieten, wodurch der Schritt der Entfernung des Inaktivierungsagences aus den pharmazeutischen Produkten oder aus der Zellkultur entfallen kann.

30

35

Spätestens mit der AIDS-Epidemie ist die Erkenntnis in das Bewußtsein der breiten Öffentlichkeit gerückt, daß nicht nur HI-Viren sondern eine Vielzahl humanpathogener Erreger z.B. durch Bluttransfusionen, Pharmazeutika, Sexualkontakte usw. übertragbar sind. Generell muß heutzutage jedes aus biologischem Material hergestellte

oder damit in Berührung gekommene Pharmakon als potentiell mikrobiell bzw. viral kontaminiert eingestuft und die Infektionssicherheit nachgewiesen werden. Durch die Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Herstellung von Pharmaka ist das Infektionsrisiko durch mikrobielle Verunreinigungen nochmals gestiegen. Bei der biotechnologischen Herstellung von Pharmazeutika werden häufig animale oder humane Zelllinien verwendet. Besonders bei diesen Zellen können Virusinfektionen durch endogene Viren oder latente Virusinfektionen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Die Infektionssicherheit von biotechnologischen Pharmazeutika, z.B. Impfstoffen, monoklonalen Antikörpern, Hormonen oder rekombinanten Proteinen erfordert daher die Entfernung jeglicher infektiöser, nicht erwünschter Partikel, was grundsätzlich mit beträchtlichen Verlusten an Forschungszeit und -mitteln bzw. Produktivität verbunden ist. Die Virussicherheit von Blut und Blutprodukten kann nur durch Prüfung und Selektion der Blutspenden in Kombination mit der Evaluierung und prophylaktischen Anwendung von wirkungsvollen und zuverlässigen Virusinaktivierungs- und Viruseliminierungsverfahren gewährleistet werden.

Zur Inaktivierung und Eliminierung von Viren aus pharmazeutischen Produkten werden verschiedenartige Methoden einzeln oder in Kombination genutzt. Bei strukturell einfachen und stabilen Produkten kommen chromatographische Methoden, pH-"shift", Extraktion und Fraktionierung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln, Salzpräzipitation, Hitzebehandlung und Filtrationstechniken zum Einsatz [Rabenau & Doerr (1990) Die Infektionssicherheit biotechnologischer Pharmazeutika aus virologischer Sicht, S. 58, GIT VERLAG GmbH, Darmstadt]. Bei empfindlichen oder komplexen biologischen Materialien werden häufig antiviral wirkende Substanzen eingesetzt. Folgende Methoden kommen u.a. zum Einsatz:

- kombinierte Anwendung von Lösungsmitteln (z.B. Etherextraktion) und synthetischen Detergenzien (z.B. Triton X-100) [B. Horowitz et al. (1985) Transfusion 25 516-522],
- 5 • Einsatz von β -Propiolacton in Kombination mit UV-Licht sowie Methylenblau in Kombination mit einer Photoaktivierung [W. Stephan (1989) S. 122-127 in: J.-J. Morgenthaler (Ed.); Virus inactivation in plasma products.; Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.; No. 10 56; Karger Basel],
- Pasteurisierung von flüssigem Material [T. Nowak (1992) Biologicals 20 83-85],
- Erhitzung von lyophilisiertem Material [D. Piszkievicz et al. (1989) S. 44-54 in: J.-J. Morgenthaler (Ed.); 15 Virus Inactivation in plasma products.; Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.; No. 56; Karger Basel],
- Bestrahlung mit Gammastrahlen (z.B. Cobalt-60) [B. Horowitz et al. (1988) Transfusion 25 523-527].

20 In der Literatur werden eine Reihe von Virusinaktivierungsverfahren für Blutprodukte, insbesondere von humanem Blutplasma, beschrieben. So offenbart A.M. Prince in US 4.591.505 ein Inaktivierungsverfahren für Hepatitis B-Viren, bei dem Alkohol und als virusinaktivierendes Agens entweder ein nichtionisches Detergenz oder Ether oder ein Gemisch aus beiden den Blutprodukten zugesetzt wird. Als nichtionische Detergenzien kommen Polyoxyethylenderivate oder Sulfobetaine zur Anwendung.

30 B. Horowitz beschreibt in US 4.841.023 und in Vox-Sang. 54: 14 - 20 (1988), S. Karger AG, Basel, die Inaktivierung von lipidenthaltenden Viren in Blutprodukten durch Fettsäuren und in US 4.613.501 durch 35 C_{12} -Alkyl-Oleinsäure.

Ein Verfahren zur Herabsetzung unerwünschter Aktivitäten wie Pyrogenität, Hepatitis-Infektiösität und Aggregation in biologischen und pharmazeutischen Produkten, insbesondere auch Blutprodukten, durch Behandlung mit nicht-denaturierenden Amphiphilen, wie nicht-ionischen Tensiden (z.B. Tween 80) wird von E. Shanbrom in EP 0 050 061 offenbart.

Die Inaktivierung und Eliminierung von Viren aus Zellkulturen erfolgt durch die Anwendung von antiviralen Substanzen, die in der Regel die Virusreplikation hemmen.

Keines der bisher eingesetzten Inaktivierungsverfahren kann mit Sicherheit alle Viren inaktivieren oder eliminieren, die in biologischem Material vorkommen können.

Verfahren wie die Pasteurisierung oder die Hitzebehandlung benötigen in der Regel die Anwendung von Stabilisatoren; zudem besteht das Problem der Denaturierung von Proteinen. Die Anwendung von Lösungsmitteln und synthetischen Tensiden, angesehen als geeignet zur Inaktivierung lipidumhüllter Viren, konnte bisher durch schwankende Ergebnisse in den Inaktivierungskinetiken oder durch fehlende systematische Untersuchungen bedingt durch die hohe Toxizität der Substanzen in Zellkulturen nicht als vollständig sicher beurteilt werden. Bei einer Vielzahl von biotechnologischen Produkten sind aufgrund der Struktur oder der Stabilität aufwendige Reinigungen oder eine Inaktivierung mit produktschädigenden oder zytotoxischen antiviralen Substanzen wie Lösungsmitteln nicht möglich.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, ein schonendes Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren in biologischen oder biotechnologischen Produkten und in Zellkulturen zur Verfügung zu stellen, mit dem diese

Produkte oder Zellkulturen sehr schnell und effektiv virusfrei gemacht werden können, ohne daß die Produkte denaturieren oder die Zellkulturen in ihrer Produktivität beeinträchtigt werden. Das Verfahren soll auch die Behandlung temperaturlabiler Produkte ermöglichen und nicht mit Substanzen arbeiten, die in vivo toxisch sind.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch den Einsatz von zyklischen β -Hydroxyfettsäure- und β -Aminofettsäurehaltigen Peptiden (Lipopeptiden) gemäß Anspruch 1 gelöst. Es hat sich gezeigt, daß die Lipopeptide ein überraschend hohes Inaktivierungspotential für lipidumhüllte Viren aufweisen und damit hervorragend zur Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe eingesetzt werden können. Lipopeptide erwiesen sich teilweise wesentlich wirksamer als die bisher zur Inaktivierung von Viren eingesetzten synthetischen Tenside. Daneben sind sie leicht biologisch abbaubar und besitzen eine wesentlich geringere in vivo-Toxizität als die synthetischen Tenside. Gegenüber herkömmlichen antiviralen Substanzen haben die erfindungsgemäß eingesetzten Lipopeptide den Vorteil, daß sie thermisch stabil sind und gut wasserlöslich.

Aus der Literatur ist bekannt, daß zwei [Ile⁷] und [Leu⁷] Surfactine, die zu den Lipopeptiden gehören, moderate Anti-HIV-1-Aktivität zeigen (H. Itokawa et al., Chem. Pharm. Bull. 42, 604 - 607 (1994)). Pumilacidine werden von N. Naruse et al. in Journal of Antibiotics, Japan XLIII 267 - 280 (1989) als antiviral wirksam gegen das Herpes-simplex-Virus (HSV-1) beschrieben. In keiner der beiden Arbeiten finden sich jedoch Hinweise auf das beträchtliche Inaktivierungspotential dieser Substanzen, die eine umfassende Inaktivierung von lipidumhüllten Viren mit geringen Konzentrationen in kürzester Zeit erlauben.

So ist das erfindungsgemäße Inaktivierungsverfahren dadurch gekennzeichnet, daß den biologischen oder biotechnologischen Produkten ein Lipopeptid oder dessen Salz oder ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren Salze in einer Gesamtkonzentration von 1 - 100 μM , vorzugsweise 1 - 80 μM , zugesetzt werden und die Inaktivierung bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min bis maximal 2h durchgeführt führt, wobei bereits nach 30 min ca. 99% der Viren inaktiviert sind. Bedingt durch die sehr geringe in vivo-Toxizität der erfindungsgemäß eingesetzten Lipopeptide ist es auch möglich, diese Inaktivierungssubstanzen in den o.g. Konzentrationen in den pharmazeutischen Produkten zu belassen. Nach erfolgter Inaktivierung können die eingesetzten Lipopeptide jedoch auch durch „reversed phase“-Chromatographie an C_{18} -Säulen oder Adsorptionschromatographie an Silicagel-Säulen aus den Produkten entfernt werden.

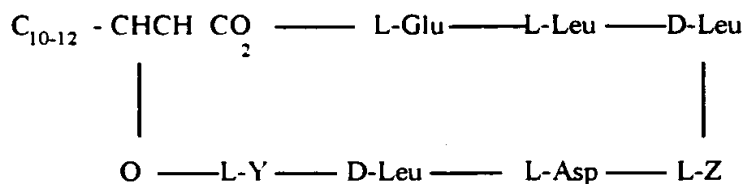
Da die erfindungsgemäß eingesetzten Lipopeptide thermisch stabil sind, kann das Inaktivierungsverfahren in Abhängigkeit von der thermischen Stabilität der zu behandelnden Produkte auch bei höheren Temperaturen durchgeführt werden, vorzugsweise bei 30 - 60°C. Es hat sich gezeigt, daß die Inaktivierungsleistung linear von der Temperatur abhängig ist. So bewirkt eine Steigerung der Temperatur um 10°C bereits einen Anstieg der Inaktivierungsrate um den Faktor 2,4, so daß die Virusinaktivierung bei 30 - 60°C mit den genannten Konzentrationen innerhalb von 5 - 30 min möglich ist. Es ist generell auch möglich, bei tieferen Temperaturen bis zu 0°C die Viren zu inaktivieren, wobei dies jedoch länger als 2 Stunden dauern kann in Abhängigkeit von der Spezies.

Erfindungsgemäß ist die Virusinaktivierung in Zellkulturen dadurch gekennzeichnet, daß dem serumfreien Kulturmedium ein Lipopeptid oder dessen Salz oder ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren Salze in einer Gesamtkonzentration von 1 - 65 μ M, vorzugsweise von 1 - 50 μ M zugesetzt werden. Wird mit serumhaltigem Kulturmedium gearbeitet, das bis zu 5 Vol.-% Serum, z.B. FKS, beinhaltet, so beträgt die zur vollständigen Inaktivierung notwendige Lipopeptidkonzentration von 10 - 100 μ M, vorzugsweise von 30 - 90 μ M.

Das erfindungsgemäße Inaktivierungsverfahren kann in einem breiten pH-Bereich von 4 - 9, vorzugsweise von 5,5 - 8, durchgeführt werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten zyklischen Lipopeptide können nach bereits beschriebenen Verfahren leicht hergestellt werden. Zahlreiche Lipopeptide werden u.a. vom Mikroorganismus *Bacillus subtilis* *in vivo* gebildet und in das umgebende Medium in hohen Konzentrationen sekretiert, aus dem sie dann isoliert werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden gentechnisch hergestellte, gentechnisch modifizierte oder natürlich vorkommende Surfactine eingesetzt, so z.B. Surfactine der nachfolgenden allgemeinen Struktur, in der Y für die Aminosäuren Leu, Ile und Val und Z für die Aminosäuren Leu und Ala stehen:



Surfactin kommt in der Natur als Gemisch mit
 unterschiedlichen Fettsäurekomponenten und
 Aminosäuresequenzen in variablen Mengenanteilen vor.
 Surfactin kann nach der Vorschrift von F. Baumgart et al.
 5 (1991), Biochem. Biophys. Res. Commun. 177 998-1005,
 hergestellt werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt kommen auch gentechnisch
 hergestellte, gentechnisch modifizierte und natürlich
 10 vorkommende Pumilacidine zur Anwendung, so z.B. die in
 Journal of Antibiotics, Japan XLIII 267 - 280 (1989)
 beschriebenen.

Im Sinne der Erfindung bedeuten biologische Produkte aus
 15 Säugern isolierte Produkte, wie z.B. Blutprodukte und aus
 Blut isolierte Produkte wie z.B. Impfstoffe und
 Plasmaderivate. Unter biotechnologischen pharmazeutischen
 Produkten werden biotechnologisch hergestellte Wirkstoffe
 wie z.B. Humanproteine (hGH, TNF, t-PA, EPO) oder
 20 Gerinnungsfaktoren (z.B. Faktor VIII) verstanden, wobei
 die Erfindung jedoch nicht auf die genannten Produkte aus
 Zellkulturen beschränkt ist.

Es zeigte sich, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren
 Herpes-Viren, vorzugsweise HSV-1, HSV-2, BHV-1, SHV-1,
 Immundefizienz-Viren, vorzugsweise HIV-1, HIV-2, SIV_{agm},
 das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) und das Semliki-
 Forest-Virus (SFV) inaktiviert werden können.

30 Nachfolgend wird die Erfindung anhand von
 Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Bestimmung der antiviralen Aktivität

Zur Bestimmung der antiviralen Aktivität von zyklischen Lipopeptiden wurden Herpes-Viren mit Surfactin behandelt und zeitabhängig die Anzahl der infektiösen Viruspartikel durch Aussaat auf frische Wirtszellen (Endstufentitration) bestimmt.

1. Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) wurde in 50 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und 80 μ M Surfactin, sterilfiltriert über Nalgene Spritzenvorfilter mit einer Porenweite von 0,1 μ m, aufgenommen. Der Anfangstiter betrug 5×10^5 ID₅₀/ml. Der pH-Wert des Inaktivierungsansatzes betrug während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl konstant pH 7,8 und die Temperatur 22°C.
2. Aus dem permanent gerührten Inaktivierungsansatz wurden zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten Aliquots entnommen. Von diesen Aliquots wurde aus einer 1:10 Vorverdünnung heraus eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100 μ l einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100 μ l einer Vero-Zell-Suspension mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml beschickt worden.
3. Die Platten wurden 6 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ bebrütet. Die Zellen in den Kontrollansätzen ohne Virusverdünnung waren zu hohen Dichten herangewachsen. Die Zellkulturen der Mikrotiterplatte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Jede Kultur mit Anzeichen eines zytopathogenen Effektes wurden als infiziert gewertet.

4. Die Titer wurden als 50%ige infektiöse Dosis (ID_{50}) nach der Methode von Spearman und Kärber [in: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. (1974) Ed. L. Cavalli-Sforza. Gustav Fischer-Verlag Stuttgart S. 171-173] berechnet und auf 1 ml des Inaktivierungsansatzes bezogen.

Innerhalb von 15 Minuten reduzierte sich der Anfangstiter von $5,1 \times 10^5 ID_{50}$ auf eine Restinfektiösität von 20 ID_{50} . Nach 30 Minuten Inkubationszeit betrug der Titer an infektiösem HSV-1 7 ID_{50} . Nach 60 Minuten konnten keine infektiösen Partikel mehr gefunden werden. Surfactin wirkt stark viruzid auf das Herpes simplex-Virus und ermöglicht eine Inaktivierung von 5 \log_{10} HSV-1-Partikeln in Serum-haltigem Kulturmedium in weniger als 60 Minuten. Damit nahm die Anzahl der umhüllten infektiösen Viruspartikel bei der Anwendung von Surfactin mit einer wesentlich höheren Geschwindigkeit als bei bisher angewandten Inaktivierungsverfahren ab.

Beispiel 2

Bestimmung des Wirkungsspektrums

Zur Bestimmung des antiviralen Wirkungsspektrums von zyklischen Lipopeptiden wurden Viren, die u.a. als besonders resistent gegen physikalische und chemische Inaktivierungsmethoden angesehen werden, mit Surfactin behandelt und zeitabhängig die verbliebene Infektiösität der Viruspartikel bestimmt.

1. In 50 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) frisch über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und 80 μM Surfactin, sterilfiltriert über Nalgene Spritzenvorfilter mit einer Porenweite von 0,1 μm , wurden die in Tabelle 1

aufgeführten membranumhüllten Viren aufgenommen. Die eingesetzten Anfangstitern sind in Tabelle 1 gezeigt. Der pH-Wert des Inaktivierungsansatzes betrug während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl konstant pH 7,8 und die Temperatur 22°C.

Tabelle 1: In den Inaktivierungsversuchen verwendete Virus/Zell-Systeme

Virus	Anfangstiter [ID ₅₀ /ml]	Wirtszelllinie	Modellvirus für
Schweine-Herpes-Virus (SHV-1)	1,6x10 ⁵	Nerzlungen-Zellen	humane Herpesviren
Bovines-Herpes-Virus (BHV-1)	4,3x10 ⁵	Rindernieren-Zellen	humane Herpesviren
Herpes-simplex-Virus Typ2 (HSV-2)	4,2x10 ⁴	Affennieren-Zellen	
Immundefizienzvirus von Affen (SIV _{aqm})	1,6x10 ⁵	humane T-Helfer-Zellen	humane Immundefizienzviren
Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV)	9,5x10 ⁶	Babyhamster-Fibroblasten	oft verwendetes Modellvirus
Semliki-Forest-Virus (SFV)	7,0x10 ⁷	Babyhamster-Fibroblasten	westliche/östliche Pferdeenzecephalitis

2. Aus dem permanent gerührten Inaktivierungsansatz wurden zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 und 360 Minuten Aliquots entnommen. Von diesen Aliquots wurde aus einer 1 : 10 Vorverdünnung heraus eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100 µl einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit

jeweils 100 μ l der entsprechenden Wirtszell-Suspension (Tabelle 1) mit Zelldichten von ca. $1,5 \times 10^5$ bis 5×10^4 Zellen/ml, entsprechend der Proliferationsrate der Wirtszelle, beschickt worden.

3. Die Platten wurden je nach Zelllinie 6 bis 18 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ bebrütet. Die Zellen in den Kontrollansätzen ohne Virusverdünnung waren zu hohen Dichten herangewachsen. Die Zellkulturen der Mikrotiterplatte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Jede Kultur mit Anzeichen eines zytopathogenen Effektes wurden als infiziert gewertet. Der zytopathogene Effekt von SIV_{agm} auf die humane T-Helfer-Zelllinie MOLT 4/8 wurde aufgrund der unzureichenden lichtmikroskopischen Auswertbarkeit entsprechend der Beschreibung des Zellproliferations-abhängigen Tests nach Mosman [J. Immunol. Meth. 65 55-63 1983] mit dem Farbstoff MTT durchgeführt.
4. Die Titer wurden entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1, Abschnitt 5, berechnet.

Alle aufgeführten umhüllten Viren ließen sich durch die Anwendung von Surfactin in Serum-haltigem Medium inaktivieren. Innerhalb von 120 Minuten waren weniger als 0,02% der eingesetzten Infektiösität von SHV-1, BHV-1 und HSV-2 nachweisbar. Dieser Anteil an Restinfektiösität wurde bei den Viren VSV und SIV_{agm} bereits nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten erreicht. Das Lipopeptid Surfactin wirkt direkt auf eine Vielzahl von lipidumhüllten Viren mit hoher Inaktivierungsgeschwindigkeit.

Beispiel 3

Einfluß der Lipopeptid-Konzentration

Der Einfluß der Konzentration an zyklischem Lipopeptid auf die Inaktivierungsleistung kann durch die Bestimmung der Inaktivierungsrate (Abnahme der Virusinfektiösität pro Inaktivierungsdauer) quantifiziert werden.

1. Schweine-Herpes-Virus (SHV-1) wurde in 25 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und Surfactinkonzentrationen von jeweils 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 und 100 μM aufgenommen. Das Surfactin wurde dazu in Kulturmedium gelöst und über Spritzenvorfilter (Nalgene, Porenweite 0,1 μm) sterilfiltriert. Der Anfangstiter betrug 2×10^4 ID₅₀/ml. Die Temperatur im permanent gerührten Inaktivierungsansatz betrug 22°C und der pH-Wert 7,8.
2. Aus dem Inaktivierungsansatz wurden nach Zugabe von Surfactin zu den Zeitpunkten 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten Aliquots entnommen und sofort 1:10 in Medium vorverdünnt.
3. Aus den Vorverdünnungen heraus wurde eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100 μl einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100 μl einer Nerzlungen-Zell-Suspension mit einer Zelldichte von ca. $1,0 \times 10^5$ Zellen/ml beschickt worden.
4. Die Inkubation der Zellkulturen in den Mikrotiterplatten, die Auswertung dieser Mikrotiterplatten sowie die Berechnung der Titer an verbliebenem infektiösem Virus zu den jeweiligen Abnahmezeiten wurde entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1, Abschnitt 4 und 5, durchgeführt.

Die Inaktivierungsrate steigt exponentiell mit der Lipopeptid-Konzentrationen an. Im Bereich der Lipopeptidkonzentrationen von 10 bis 80 μM Surfactin stieg die Inaktivierungsrate von 0,19 auf 0,6 \log_{10} ID₅₀/10 min. Bei einer Surfactin-Konzentration von 100 μM wurden die eingesetzten infektiösen SHV-1-Partikel mit einer Rate von 1,4 \log_{10} ID₅₀/10 min inaktiviert. Das Lipopeptid Surfactin ermöglicht die Inaktivierung lipidumhüllter Viren in einem weiten Konzentrationsbereich. Die Lipopeptidkonzentration kann entsprechend den Produkt- und Verfahrenseigenschaften gewählt werden.

Beispiel 4

Virusinaktivierung bei verschiedenen Reaktionstemperaturen

Der Einfluß der Temperatur während der Inaktivierungsreaktion auf die Virusinaktivierung kann durch die Bestimmung der Inaktivierungsrate (Abnahme der Virusinfektiösität pro Inaktivierungsdauer) quantifiziert werden.

1. Schweine-Herpes-Virus (SHV-1) wurde in 25 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und einer Surfactinkonzentrationen von 80 μM aufgenommen. Das Surfactin wurde in Kulturmedium gelöst und über Spritzenvorfilter (Nalgene, Porenweite 0,1 μm) sterilfiltriert. Der Anfangstiter betrug 1×10^5 ID₅₀/ml. Der pH-Wert des permanent gerührten Inaktivierungsansatzes betrug während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl konstant pH 7,8. Die jeweiligen Inaktivierungsansätze wurden auf 5, 10, 15, 20, 25 und 30°C in einem

Wasserbad [Grant, Modell W14 - ZD/CZ1] mit einer Genauigkeit von $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$ eingestellt und permanent gerührt.

2. Aus dem Inaktivierungsansatz wurden nach Zugabe von Surfactin zu den Zeitpunkten 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten Aliquots entnommen und sofort 1:10 in Medium vorverdünnt.
3. Aus den Vorverdünnung heraus wurde eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100 μl einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100 μl einer Nerzlungen-Zell-Suspension mit einer Zelldichten von ca. $1,0 \times 10^5$ Zellen/ml beschickt worden.
4. Die Inkubation der Zellkulturen in den Mikrotiterplatten, die Auswertung dieser Mikrotiterplatten sowie die Berechnung der Titer an verbliebenem infektiösem Virus zu den jeweiligen Abnahmezeiten wurde entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1, Abschnitt 4 und 5, durchgeführt.

Im getesteten Temperaturbereich von 5 bis 30°C erfolgte eine deutliche Inaktivierung des SHV-1 im Serum-haltigen Kulturmedium. Die Inaktivierungsrate stieg linear von 0,05 für 5°C über 0,25 für 20°C nach 0,45 \log_{10} ID₅₀/min für 30°C an. Mit dem Lipopeptid Surfactin ist die Behandlung von temperaturlabilen Produkten zur Inaktivierung lipidumhüllter Viren wie auch eine zeitsparende schnelle Inaktivierung bei hohen Temperaturen möglich.

Beispiel 5**Bestimmung der Zytotoxizität von Surfactin auf adhärente Zellen**

Die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der zyklischen Lipopeptide auf adhärente Zellen in Kultur erfolgte in Abwandlung des Kristallviolett-Tests von D.A. Flick und G.E. Gifford [J. Immunol. Meth. 68 167-175 1984].

1. Frisch trypsinierte Zellen der Linien ML (Nerz-Lungenzellen), CV1 (Nierenzellen der grünen Meerkatze), Hep₂ (humane Epithelzellen), CRFK (Katzen-Nierenzellen) und BHK21 (Hamster-Nierenzellen) wurden jeweils in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) frisch über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) aufgenommen und 100 µl Zellsuspension (ca. 1-2 x10⁵ Zellen/ml) in jeweils eine Vertiefung einer 96-Loch-Flachboden-Kulturplatte (Nunc) pipettiert. Die Kultur wurde 3 Stunden bei 37°C in Gegenwart 5 Vol.-% CO₂ bebrütet.

2. In Kulturmedium gelöstes Surfactin wurde sterilfiltriert (Nalgene Spritzenvorfilter, Porenweite 0,1 µm) und auf verschiedene Konzentrationen mit frischem Kulturmedium verdünnt. 50 µl des Nährmedium mit verschiedenen Konzentrationen Surfactin wurde zu den angewachsenen Zellen gegeben. Die Kulturplatte wurde weitere 2 Tage bei 37°C und in Gegenwart von 5 Vol.-% CO₂ bebrütet.

3. Die Zellen der Linien ML, Hep₂ und BHK21 waren nach 3 Tagen, die Zellen der Linien CV1 und CRFK nach 8 Tagen in den Kontrollreihen zu hohen Zelldichten herangewachsen und bildeten einen homogenen Zellrasen. Der Mediumüberstand wurde abgeschlagen und zu jedem Ansatz 50 µl Kristallviolettlösung pipettiert. Die Kristallviolettlösung setzte sich zusammen aus 3,75 g Kristallviolett, 1,75 g NaCl, 161,5 ml Ethanol abs.,

43,2 ml 37%igem Formaldehyd (alle Chemikalien von Merck) ad 500 ml deionisiertes und destilliertes Wasser. Die Kristallviolettlösung wurde nach 20 min intensiv aus den Kavitäten mit deionisiertem Wasser herausgewaschen und die Mikrotiterplatte an der Luft getrocknet.

4. Der verbleibende zellgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 μ l einer Lösung aus 50% Ethanol abs., 0,1% Eisessig, 49,9% deionisiertem und destilliertem Wasser je Kavität in Lösung gebracht und durch intensives Schütteln über 5 Minuten homogen verteilt. Die photometrische Bestimmung der Farbintensität, die in linearem Zusammenhang zur Zelldichte steht, erfolgte bei 550 nm (EAR 400 AT, SLT-Labinstruments). Es wurde die Konzentration ermittelt, die eine Reduzierung der Zellzahl um 50% bewirkte.

Es konnte für das Surfactin ein zytotoxischer Effekt von 50% bei einer Mediumkonzentration von 48 μ M für die Hep₂-, von 37 μ M für die BHK21-, von 45 μ M für die CRFK- und von 43 μ M für die ML-Zellen ermittelt werden. Die CRFK- und Hep₂-Zellen zeigten bei Konzentrationen bis zu 30 μ M Surfactin keine Veränderungen am Zellwachstum. Bei den ML- und BHK21-Zellen wurde bei dieser Surfactin-Konzentration eine Wachstumsverringerung um 15% beobachtet. Die in Beispiel 1 angewandte Konzentration von 40 μ M Surfactin bewirkte in Langzeituntersuchungen eine Reduzierung der Zelldichte auf 15% bei den CRFK- und Hep₂-Zellen, auf 45% bei den ML-Zellen und auf 57% bei den BHK21-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollansätzen. Keine der getesteten Kulturen tolerierte höhere Surfactin-Konzentrationen als 65 μ M. Alle getesteten Zellkulturen tolerieren die Anwesenheit des Lipopeptids Surfactin über den für eine Inaktivierung von lipidumhüllten Viren notwendigen kurzen Zeitraum.

Beispiel 6

Biotechnologische Anwendung

Inaktivierung von umhüllten Viren in Zellkulturen

5 Mit Hilfe der Gentechnik kann jede beliebige Zelllinie potentiell wertvolle Substanzen wie Interferone, Wachstumsfaktoren, u.a. produzieren. Diese Zellkulturen können unter Umständen mit verschiedenen Virusspezies kontaminiert sein. Viruskontaminationen sollten daher schon in der Ausgangszellkultur entfernt werden. Als Beispiel wird hier die Eliminierung eines Herpesvirus aus einer Nerz-Lungenzellkultur beschrieben. Schweine-Herpesvirus Typ 1 (SHV-1) induziert einen deutlichen zytopathogenen Effekt, an dessen Ausbleiben der Inaktivierungserfolg direkt sichtbar wird.

1. Ca. 1×10^4 frisch trypsinierte ML-Zellen (Nerz-Lungenzellen) wurden in einer Petrischale (10 cm Ø, Nunc) mit Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) passagiert. Das Zellkulturmedium wurde von den angewachsenen Zellen entfernt und diese mit ca. 100 TCID₅₀ SHV-1 infiziert. Nach einer einstündigen Inkubation wurde das Inoculum abgenommen und der Zellrasen mit 10 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) fötalem Kälberserum (GIBCO) und 50 µM Surfactin überschichtet. Das Surfactin wurde dazu in einer Konzentration von 1 µM in PBS gelöst und autoklaviert (123°C über 23 min).

2. Die ML-Zellkultur wurde 3 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ bebrütet. Die Zellen bedeckten 30% des Petrischalenbodens und konnten mit 0,25% Trypsin, 2 µM EDTA, abgelöst werden. Alle Zellen wurden erneut in eine Petrischale (10 cm Ø, Nunc) mit Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) über

30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und 40 µM Surfactin passagiert. Die Behandlung wurde zweimal wiederholt.

3. Nach anschließender zehnmaliger Passage ohne Surfactin wurde 1 ml des Zellkulturüberstandes auf eine frische ML-Kultur gegeben und diese nach 7 Tagen Inkubation auf einen Virus-bedingten zytopathogenen Effekt (CPE) mit dem Lichtmikroskop untersucht.

In den ML-Zellkulturen wurde kein Virus-bedingter zytopathogener Effekt beobachtet.

Beispiel 7

Produktsicherheit

Inaktivierung von SIV in einer Albuminlösung

Serum enthält eine Vielzahl von wirtschaftlich und medizinisch bedeutsamen Bestandteilen, z. B. Hormone, Immunglobuline, Gerinnungsfaktoren, Enzyme, Cholesterine, Lipoproteine, Albumine u.a.. Serum kann mit organischen Lösungsmitteln, wie Ethanol, Ether, Polyethylenglycol bei niedrigen Temperaturen und durch Präzipitation mit Salzen oder pH-Veränderungen fraktioniert und so die Bestandteile aufgereinigt werden. In Blut vorkommende Viren, wie das Retrovirus HIV, können jedoch als infektiöse Partikel in das aufgereinigte Blutprodukt gelangen. Als Beispiel für eine sich notwendigerweise anschließende Virusinaktivierung wurde Rinderserumalbumin (BSA) mit Surfactin behandelt. Zur Demonstration des Wirkungspotentials wurde das Albumin mit einer Dosis des Affenimmundefizienzvirus (SIV) versetzt, die unter natürlichen Bedingungen nicht gefunden wird, und zeitabhängig die Anzahl der infektiösen Viruspartikel durch Aussaat auf frische Wirtszellen (Endstufentitration) bestimmt.

1. Affenimmundefizienzvirus (SIV) wurde in 50 ml PBS mit 50 mg/ml BSA und 80 μ M Surfactin (gelöst in PBS in einer Konzentration von 1 mM und autoklaviert) aufgenommen. Der Anfangstiter betrug $1,6 \times 10^5$ TCID₅₀/ml. Der pH-Wert des Inaktivierungsansatzes betrug während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl konstant pH 7,8 und die Temperatur 22°C.

2. Aus dem permanent gerührten Inaktivierungsansatz wurden zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten Aliquots entnommen. Von diesen Aliquots wurde aus einer 1:10 Vorverdünnung heraus eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100 μ l einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100 μ l einer Molt4, Klon 8-Zell-Suspension mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml beschickt worden.

3. Die Platten wurden 14 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ bebrütet. Die Zellen in den Kontrollansätzen ohne Virusverdünnung waren zu hohen Dichten herangewachsen. Die Zellkulturen der Mikrotiterplatte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Jede Kultur mit Anzeichen eines zytopathogenen Effektes wurden als infiziert gewertet.

4. Die Titer wurden als 50%ige infektiöse Dosis (TCID₅₀) nach der Methode von Spearman und Kärber [in: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. (1974) Ed. L. Cavalli-Sforza. Gustav Fischer-Verlag Stuttgart S. 171-173] berechnet und auf 1 ml des Inaktivierungsansatzes bezogen.

Innerhalb von 15 Minuten reduzierte sich der Anfangstiter von $1,6 \times 10^5$ TCID₅₀ auf eine Restinfektiösität von $1,5 \times 10^3$ TCID₅₀. Nach 60 Minuten Inkubationszeit betrug der Titer an infektiösem SIV 7 TCID₅₀. Nach 120 Minuten konnten keine infektiösen Partikel mehr gefunden werden.

Beispiel 8

Produktsicherheit

Kombinierte Anwendung von Surfactin und feuchter Hitze
5 zur Inaktivierung von SIV in einer Albuminlösung

Blut- und biotechnologisch erzeugte Produkte werden im isolierten und gereinigten Zustand häufig einer Hitzebehandlung (Pasteurisierung) unterzogen. Diese
10 Hitzebehandlung kann mit einem SD-Verfahren kombiniert werden. Surfactin ist aufgrund seiner Thermostabilität ebenfalls in Kombination mit einem Hitzeinaktivierungsverfahren einsetzbar. Das Beispiel beschreibt die Inaktivierung des Affenimmundefizienzvirus
15 (SIV) in Serumalbumin zur Demonstration des synergistischen Effektes von Hitze und Surfactin bei der Virusinaktivierung.

1. Affenimmundefizienzvirus (SIV) wurde in 50 ml PBS mit 50 mg/ml BSA und 80 μ M Surfactin (gelöst in PBS in
20 einer Konzentration von 1 μ M und autoklaviert) aufgenommen. Der Anfangstiter betrug $1,6 \times 10^5$ TCID₅₀/ml. Der pH-Wert des Inaktivierungsansatzes betrug während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl konstant pH 7,8. Vor der Zugabe der Virussuspension wurde der Ansatz in einem Wasserbad auf 60°C vortemperiert und während des Experiments konstant gehalten.

2. Aus dem permanent gerührten Inaktivierungsansatz wurden zu den Zeitpunkten 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45,
30 und 60 Minuten Aliquots entnommen. Von diesen Aliquots wurde aus einer 1:10 Vorverdünnung heraus eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit
35 jeweils 100 μ l einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit

jeweils 100 μ l einer Molt4, Klon 8-Zell-Suspension mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml beschickt worden.

3. Die Platten wurden 14 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ bebrütet. Die Zellen in den Kontrollansätzen ohne Virusverdünnung waren zu hohen Dichten herangewachsen. Die Zellkulturen der Mikrotiterplatte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Jede Kultur mit Anzeichen eines zytopathogenen Effektes wurden als infiziert gewertet.

4. Die Titer wurden als 50%ige infektiöse Dosis (TCID₅₀) nach der Methode von Spearman und Kärber [in: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. (1974) Ed. L. Cavalli-Sforza. Gustav Fischer-Verlag Stuttgart S. 171-173] berechnet und auf 1 ml des Inaktivierungsansatzes bezogen.

Innerhalb von 5 Minuten reduzierte sich der Anfangstiter von $1,6 \times 10^5$ TCID₅₀ auf eine Restinfektiösität von $9,3 \times 10^2$ TCID₅₀. Nach einer 20 minütigen Inkubation konnten keine infektiösen Partikel mehr gefunden werden. Beim kombinierten Hitze/Surfactin-Verfahren wurde die Infektiösität des eingebrachten SIV mindestens um einem Faktor 10 schneller inaktiviert als durch die gleiche Surfactinkonzentration bei Raumtemperatur oder durch Hitzebehandlung ohne antivirale Zusätze.

Beispiel 9

Maximale Inaktivierungsraten:

Für drei Virusfamilien wurden die maximal erreichbaren Inaktivierungsraten bestimmt. Die Inaktivierungsbedingungen waren: pH 7,8; 80 μ M Surfactin; in wässrigem Medium mit 5% fötalem Kälberserum; gerührt; 22°C.

Virus	Abnahme der Infektiösität [\log_{10} TCID ₅₀ [#]]			
	nach 5 min	nach 30 min	nach 60 min	nach 120 min
Herpesviren	2,30	4,90	5,40	-
Retroviren	1,30	2,90	4,40	-
Rhabdoviren	1,00	3,60	4,50	5,40

50% Gewebekultur infizierende Dosis

Patentansprüche

1. Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren
in biologischen oder biotechnologischen Produkten
oder in Zellkulturen,

dadurch gekennzeichnet,

daß

a) den Produkten ein zyklisches β -Hydroxyfettsäure-
und β -Aminofettsäure-haltige Peptid (Lipopeptid)
oder ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren Salze
in einer Konzentration von 1 - 100 μ M zugesetzt
werden oder

b) bei der Inaktivierung von Viren in Zellkulturen
dem serumfreien Kulturmedium ein Lipopeptid oder
ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren Salze in
einer Konzentration von 1 - 65 μ M oder dem
serumhaltigen Kulturmedium, das bis zu 5 Vol.-%
Serum enthält, in einer Konzentration von 10 -
100 μ M zugesetzt werden und

die Inaktivierung bei Raumtemperatur innerhalb von 30
min bis maximal 2 h durchgeführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Virusinaktivierung in biologischen oder
biotechnologischen Produkten bei höheren Temperaturen
als Raumtemperatur, vorzugsweise 30 - 60°C, innerhalb
von 5 - 30 min durchgeführt wird.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Lipopeptide nach Abschluß der Inaktivierung in den Produkten verbleiben können.

- 5 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Lipopeptide gentechnisch hergestellte,
gentechnisch modifizierte oder natürlich vorkommende
Surfactine oder Pumilacidine eingesetzt werden.
- 10
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß Herpes-Viren, vorzugsweise HSV-1, HSV-2, BHV-1,
15 SHV-1, Imundefizienz-Viren, vorzugsweise HIV-1, HIV-
2, SIV_{agm}, das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) und
das Semliki-Forest-Virus (SFV) inaktiviert werden.

Zusammenfassung

5 Die Erfindung betrifft ein äußerst effizientes Verfahren
zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren, wie z.B.
Herpes- oder Retroviren in biologischen oder
biotechnologischen - insbesondere pharmazeutischen -
10 Produkten und in Zellkulturen, indem ein zyklisches β -
Hydroxyfettsäure- und β -Aminofettsäure-haltiges Peptid
(Lipopeptid) oder ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren
Salze in bestimmten Konzentrationen zugesetzt werden. Es
hat sich gezeigt, daß Lipopeptide ein überraschend hohes
15 Inaktivierungspotential für lipidumhüllte Viren aufweisen
und daneben den Vorteil einer sehr geringen in vivo-
Toxizität bieten, wodurch der Schritt der Entfernung des
Inaktivierungsagences aus den pharmazeutischen Produkten
oder aus der Zellkultur entfallen kann.

THIS PAGE BLANK (USPTO)